

氏 名	北岡 文美代
学 位 の 種 類	博士（学術）
学 位 記 番 号	博甲第 1123 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 21 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)
学 位 授 与 の 題 目	<i>Akebia</i> 属植物の DNA 解析と資源に関する研究
論文審査委員（主査）	垣内 信子（医薬保健研究域・准教授）
論文審査委員（副査）	御影 雅幸（医薬保健研究域・教授）、太田 富久（医薬保健研究域・教授）、 小谷 明（医薬保健研究域・教授）、高野 文英（医薬保健研究域・准教授）

The stem of two *Akebia* plants, *Akebia quinata* Decaisne (Aq) and *A. trifoliata* Koidzumi (At) of Lardizabalaceae, are standardized as “Mokutsu” in Japanese Pharmacopoeia. Three *Akebia* plants, Aq, At and *A. × pentaphylla* (Ap) grow wild in Japan. With the aim of carrying out molecular genetic identification of species of *Akebia* plants and of discriminating *Akebiae* Caulis from the other related crude drugs originated from non-*Akebia* plants, DNA sequencing analysis of *Akebia* plants collected from various parts of Japan and the southern part of the Korean Peninsula was performed. The specimens identified morphologically as Aq and At had respective common ITS sequences, which were distinguishable from each other. Cloning experiments of Ap specimens showed that their ITS contained both common sequences of Aq and At. Based on the sequences of *Akebia* species found here, we propose PCR-RFLP methods to discriminate *Akebiae* Caulis from related crude drugs and to distinguish the three *Akebia* plants. We found that the locality of three *Akebia* plants could be distinguished by nucleotide difference at six points in ITS. The results of these ITS sequences enabled discrimination of the locality of *Akebiae* Caulis.

【背景】漢方生薬「木通」は、消炎性利尿、鎮痛薬として用いられ、小便不利、関節リウマチ、神経痛、月経不通などの症状に応用する五淋散や竜胆瀉肝湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯などに配合される生薬である。第 15 改正日本薬局方に収載される生薬「木通」は、アケビ科（Lardizabalaceae）のアケビ *Akebia quinata* Decaisne またはミツバアケビ *Akebia trifoliata* Koidzumi のつる性の茎が規定されている。一方、2000 年度中華人民共和国薬典には上記 *Akebia* 属植物由来の「木通」は収載されず、ウマノスズクサ科（Aristolochiaceae）の *Aristolochia manshuriensis* Kom. 由来の関木通やキンボウゲ科（Ranunculaceae）の *Clematis armandii* Franch. または *Clematis montana* Buch.-Ham. 由来の川木通が収載されていた。しかし近年、*Aristolochia* 属植物由来の関木通を長期服用した際のアリストロキア酸による腎障害が度々報告されたため、2005 年度から関木通は中国薬典から除外され、使用が禁止された。これに伴い、生薬「木通」の原植物が見直され、古来の基源と考えられているアケビを含む *Akebia* 属植物が再収

載された。関木通の使用は禁止されたが、いまだ市場で見られることがあり、生薬「木通」に混入している可能性が考えられる。また、日本において近年個人輸入による関木通の使用に関する腎障害が報告されている。一方、引き続き中国薬典に記載されている川木通の原植物は *Clematis* 属植物であり、元来の基源と考えられている *Akebia* 属植物とは期待する薬効が異なる可能性が示唆される。数々の漢方処方箋は古来よりの長期にわたる経験をもとに形成されたものであり、期待する効果を得るためには正しい基源のものを使用すべきである。

中国において *Akebia* 属植物は、果実を基源とする生薬“八月札”の原植物として用いられており、近年、中国から生薬“八月札”の茎として *Akebia* 属植物が輸入され、生薬「木通」として日本市場に出回っている例もあるようであるが、生薬「木通」は、数少ない日本市場の全需要を日本国内の野生品でまかなうことのできる生薬のひとつである。アケビ科 *Akebia* 属植物のうち日本に自生するものには、アケビ、ミツバアケビ、上記 2 種の雑種と考えられているゴヨウアケビ *Akebia* × *pentaphylla* Makino がある。いずれも本州、四国、九州の山野に自生するつる性の木本である。ミツバアケビは北海道にも自生している。*Akebia* 属植物は葉の数、形、花の形態、色により区別される。形態は小葉が 5 枚で全縁、花は数個の雄花と 1-2 個の雌花を付け、色は淡紫色のものがアケビ、小葉は 3 枚で波状の鋸歯があり、花は 10 数個の小型の雄花と 1-3 個の大型の雌花を付ける、色は黒紫色のものがミツバアケビ、小葉がふつう 5 枚、ときに 3 枚、形はミツバアケビに似ていて少数の波状鋸歯があり、花もミツバアケビに近いが、色は暗い紫色のものがゴヨウアケビであるとしている。ゴヨウアケビはアケビとミツバアケビの中間的な形態を示し雑種とされている。薬材としての種の区別はされておらず、市場にゴヨウアケビ由来の「木通」が流通している可能性は高いと考えられる。

*Akebia* 属植物由来のものを含む中国産の数種の「木通」を用いて薬理実験を行い、ミツバアケビ由来の「木通」は殺菌作用が最強であり、利尿作用が顕著であることから、薬材として最も優れているとの報告がされている。日本においても日本産アケビとミツバアケビの成分分布に関する研究がいくつかなされており、日本産アケビとミツバアケビの主含有 triterpene 配糖体に差異があるとの報告がある。そして、日本産アケビとミツバアケビについて triterpene 配糖体を指標とした逆相 TLC 分析による識別方法も提案されている。これらよりアケビとミツバアケビには成分の違いによる薬理的な差異がある可能性が考えられる。しかし、ゴヨウアケビについての報告はされていない。薬としての *Akebia* 属植物のより良い効果を得るためには、原植物の使い分けが必要であることが示唆されることから、分類群を簡便かつ確実に判別する方法が必要である。DNA を用いた鑑別方法は、類似生薬の判別や分類群の判別に実用的な方法である。そこで本研究では、生薬「木通」の一大生産地として知られている四国地方を中心に日本及び東アジアに自生している *Akebia* 属植物の DNA 解析研究を行い、*Akebia* 属植物 3 分類群のアケビ、ミツバアケビ、ゴヨウアケビの関係を明らかにし、類似生薬と *Akebia* 属植物及び *Akebia* 属植物 3 分類群の鑑別法の確立を試みる。そして、生薬「木通」の資源について考察する。

【材料と方法】四国地方（徳島、高知、愛媛県）において 2005 年 4 月 26 日から 28 日に、近畿地方（和歌山、奈良、三重県）において 2005 年 5 月 3 日及び 2006 年 4 月 29 日から 5 月 5 日に *Akebia* 属植物の採集を行った。実験材料は、四国地方（A）61

検体、近畿地方 (C) 52 検体に加えて、播磨灘周辺 (B) 54 検体、島根県 (D) 23 検体、北九州地方 (E) 23 検体、石川県 (F) 12 検体、さらに、新潟県、長野県、山梨県、韓国に自生していた *Akebia* 属植物である (図 1)。DNA 解析方法は、以下のとおりである。まず、植物体から DNA を抽出し、PCR 法により核 DNA の ITS 領域を増幅した。次に、PCR 産物を精製し、direct sequencing 法により塩基配列を確認した。direct sequencing で解析不能であった検体は、ITS 領域の PCR 産物をクローニングすることにより DNA 塩基配列を検討した。

#### 【結果及び考察】

1. *Akebia* 属植物の ITS 領域の DNA 塩基配列解析の結果、アケビ、ミツバアケビの 2 種は、核 DNA の ITS 領域の塩基配列について種に特有な明確な違いがみられ、これらを区別できることが分かった。また、ゴヨウアケビと同定された検体は、アケビまたはミツバアケビと相同な塩基配列を同程度に、さらに両者の接合体の塩基配列を有することもあることが確認された。ゴヨウアケビは分類群特有の塩基配列をもってはいなかったが、アケビとミツバアケビの相同あるいは両者の接合体の塩基配列を併せもつことによってアケビやミツバアケビとは区別できた。この結果は、ゴヨウアケビがアケビとミツバアケビの雑種であるということを分子遺伝的に明らかにしたものである。ゴヨウアケビには交雑箇所の違いにより種々な DNA 型が存在することが分かった。
2. 前述のように、生薬「木通」には、毒性を有するアリストロキア酸を含む *Aristolochia* 属植物由来の関木通、*Akebia* 属植物とは期待する薬効が異なる可能性が示唆される *Clematis* 属植物由来の川木通などの類似生薬があり、*Akebia* 属植物に混入する可能性があるため、*Akebia* 属植物と類似生薬との簡便かつ確実な区別方法が早急に望まれている。そこで、本研究において解明した *Akebia* 属植物の DNA 塩基配列から、共通する制限酵素 Bam H I 認識部位を発見し、制限酵素 Bam H I を用いた PCR-RFLP 法により *Akebia* 属植物と他属植物を簡便に判別できることを確認した。
3. *Akebia* 属植物アケビ、ミツバアケビの 2 種の間には、triterpene 類の含有組成が違ふといういくつかの報告があることから、本研究においてアケビとミツバアケビの含有 triterpene 類の組成の差異を確認し、さらにゴヨウアケビについて検討を行なった結果、ゴヨウアケビは含有 triterpene 類において、上記 2 種の中間的な組成を示すことが分かった。これより、含有 triterpene 類の成分組成は、*Akebia* 属植物 3 分類群の植物分類学的関係を反映していることが示唆された。
4. 生育地調査により、*Akebia* 属植物にはアケビとゴヨウアケビの中間的な形態をもつものやミツバアケビとゴヨウアケビの中間的な形態をもつものなど、形態により分類群の判別が困難なものの存在を確認した。*Akebia* 属植物のうちアケビとミツバアケビの 2 種は棲み分ける傾向にあるものの、多くは 3 分類群が同場所に自生しており、薬材の採集時期は冬であり、花も葉もない時期に行われることから、ゴヨウアケビの薬材への混入は容易に考えられる。実際に、生薬「木通」にゴヨウアケビ由来のものが確認された。上記のように *Akebia* 属植物 3 分類群の含有成分組成が異なっていることなどから、*Akebia* 属植物 3 分類群を簡便に判別する方法が必要である。本研究において解明した *Akebia* 属植物の塩基配列から、これら 3 分類群の ITS 領域において、制限酵素 Tth 111 I 認識部位の差異があることが判った。これを利用し、制

限酵素 Tth 111 I による PCR-RFLP 法により *Akebia* 属植物 3 分類群を判別できることを確認した。

5. 天産物である生薬は、各産地間で品質に差があることが考えられた。そこで、日本各地で採集した各 *Akebia* 属植物の産地間の DNA 型を明らかにし、産地特定方法の開発を試み、それぞれの地域に特徴的な塩基配列を明らかにした。また、播磨灘周辺には特徴的に、塩基 No.86 の塩基に欠損があるアケビが出現した。この塩基 No.86 の塩基に欠損があるアケビの県ごとの出現する確率を述べた。そしてこれらが、生薬「木通」の主産地である四国地方 (A) の徳島県に多く存在することを発見した。

生薬のよりよい効果を得るために、生薬「木通」の原植物を判別することは重要である。本研究を受け、ゴヨウアケビなどの、アケビとミツバアケビの中間的な性質をもつ *Akebia* 属植物についても薬材としての可能性を評価する必要があると考える。

図 1 採集地



## 学位論文審査結果の要旨

日本薬局方収載生薬である「木通」の起源は *Akebia quinata* および *A. trifoliata* の蔓性の茎と規定され、日本各地の野生 *Akebia* 属植物が用いられている。一方、中国では *Akebia* 属植物以外の植物由来の木通も用いられ、その中には腎障害を引き起こす *Aristolochia manshuriensis* 等も含まれている。論文提出者は、*Akebia* 属植物の分子生物学的な同定法を確立すべく、日本各地の *Akebia* 属植物の資源の状況を調べ、核リボソーム DNA の非コーディング領域である internal transcribed spacer (ITS) の塩基配列を解析した。結果、*Akebia* 属植物に共通な塩基配列を見だし、これを用いた他植物との鑑別法を開発した。また、*A. quinata*、*A. trifoliata* および両者の種間雑種 *A. pentaphylla* の3分類群の鑑別法を開発した。さらに日本各地の *Akebia* 属植物の ITS 塩基配列を比較することで、産地に特徴的な DNA 塩基配列を見だし、産地の特定法を提案した。これらの成果は日本原産の *Akebia* 属植物 3 分類群の分子遺伝学的な関係を明確にするとともに、生薬原料の標準化の指標を与えるものであり、資源の有効利用に寄与する。よって、博士（学術）に値する。

---